Влияние наночастиц оксида трехвалентного железа на активность полифенолоксидазы в проростках пшеницы

Г.Г. Мамедли[1*], С.Н. Омарова[1], А.А. Гулиев[1], И.В. Азизов[2]

*[1]Бакинский государственный университет, академик З.Халилова, 23, Баку AZ1148, Азербайджан; *E-mail: mamedligunel92@gmail.com*
[2]Институт молекулярной биологии и биотехнологий НАН Азербайджана, И. Набиев, 11, Баку AZ1073, Азербайджан
Принято к печати: 28.11.2019

Изучено изменение содержания фенольных соединений в двухнедельных проростках различных сортов твердой и мягкой пшеницы под воздействием наночастиц оксида трехвалентного железа. Полученные данные свидетельствовали об активности фермента полифенолоксидазы. С этой целью были использованы соответствующие методические указания. Установлено, что интенсивность фенольного метаболизма в проростках пшеницы под воздействием наночастиц оксида трехвалентного железа зависит от сортовых характеристик. В проростках протестированных сортов твердой пшеницы наночастицы оксида трехвалентного железа приводили либо к незначительному усилению окисления полифенолов (Ягут и Гарагылчыг-2), либо к резкому снижению активности полифенолоксидазы (Гарабаг), либо практически не вызывали каких-либо изменений (Гырмызы бугда) в интенсивности окисления полифенолов. В случае мягких сортов пшеницы, за исключением сорта Мирбашир-128, воздействие наночастиц оксида трехвалентного железа приводило к повышению активности полифенолоксидазы. Полученные данные могут служить основанием для отбора сортов пшеницы с целью получения мучных изделий более высокого качества.

Ключевые слова: *Твердые и мягкие сорта пшеницы, фенольные соединения, полифенолоксидаза, наночастицы оксида трехвалентного железа*

ВВЕДЕНИЕ

Сегодня изучение проблемы устойчивости растительных организмов к неблагоприятным факторам внешней среды является одним из центральных вопросов биологии. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что в стрессовых условиях усиливается генерация активных форм кислорода (АФК) в клетках и возрастает активность системы антиоксидантной защиты (Креславский и др., 2012). Наряду с антиоксидантными ферментами в утилизации АФК в клетках растений принимают участие и неферментные компоненты. Все эти антиоксиданты находятся в постоянном взаимодействии и поддержание их баланса важно для сохранения жизнеспособности растений в стрессовых условиях (Фролова и др., 2011).

К неферментным компонентам антиоксидантной системы растительной клетки, наряду с другими компонентами, относятся также и фенольные соединения. Будучи весьма реакционноспособными веществами, эти соединения вторичного метаболизма способны инактивировать свободные радикалы, тем самым защищая клетки от действия АФК, участвовать в окислительно-восстановительных процессах, регуляции роста и развития растений (Janas et al., 2002). В то же время до сих пор вклад фенольных соединений в общую антиоксидантную систему растительных клеток изучен недостаточно. В связи с этим особый интерес представляет изучение не только изменения количества фенольных соединений под влиянием различных факторов, но и изменения активности ферментов, участвующих в их метаболизме, в частности полифенолоксидазы (КФ 1.14.18.1), катализирующей их окисление.

Полифенолоксидаза (КФ 1.14.18.1) – медь-

содержащий энзим, являющийся одной из терминальных оксидаз растительной клетки и окисляющий в присутствии молекулярного кислорода различные фенолы и их производные с образованием соответствующих хинонов (Олениченко и др., 2006). Хотя данный фермент не входит в состав системы антиоксидантной защиты, его роль в ответных реакциях на неблагоприятные условия произрастания растений неоспорима.

С другой стороны, поскольку в последние годы в стране и за рубежом происходит бурное развитие нанотехнологий, изучение их биологических эффектов является одной из основных задач современной биологии (Коваленко, 2006). Несмотря на многочисленные исследования, посвященные изучению влияния наночастиц на функционирование антиоксидантной системы, до сих пор многие аспекты их влияния не ясны.

В целом, изучению воздействия нанометаллов на растительные организмы посвящены многочисленные экспериментальные работы и обзорные статьи (Masarovicova et al., 2013), согласно которым интенсивность развития биологических эффектов высокодисперсных металлов отличается от эффектов их оксидных форм, и во многом зависит от наличия в составе металлов переменной валентности. В связи с этим, актуальным является расшифровка характерных механизмов устойчивости растений к структурно различающимся наночастицам металлов и их оксидам на уровне не только морфологических характеристик, но и деятельности антиоксидантной системы и в целом жизнеспособности клеток, через которые формируется адаптивная стратегия (LinD, 2007).

Влияние оксидов наночастиц трехвалентного железа на биохимические процессы в проростках пшеницы не изучено. Поэтому целью нашей работы было изучить влияние наночастиц оксида трехвалентного железа на активность полифенолоксидазы в двухнедельных проростках пшеницы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили по четыре сорта твердой (Гырмызы бугда, Гарабаг, Ягут и Гарагылчыг-2) и мягкой (Мирбашир-128, Гобустан, Дагдаш и Шеки-1) пшеницы, приобретенные из Научно-исследовательского института земледелия при Министерстве сельского хозяйства Азербайджана.

Сначала все семена дезинфицировали 0,01% раствором $KMnO_4$ в течение 5 минут и после трехкратного промывания дистиллированной водой, группу контрольных семян посеяли в пластиковых горшках диаметром 15 см с почвой (Сальянского района, село Марышлы, Азербайджан) по 30 штук на глубине не более 2 см и расстоянии не менее 0,5 см друг от друга. Опытные образцы семян по 30 штук обработали 100 мг нанопорошка оксида трехвалентного железа (Fe_2O_3) размером 20 на 40 нм (Skyspring NanomaterilsInc, США) и только после этого перенесли в пластиковые горшки с почвой.

Подготовленные таким образом контрольные и опытные образцы поместили в шкаф (Taisite GZX-300E, Китай) при 14-часовом освещении, температуре 24±1°С и влажности 80±5%, не допуская высыхания. На 14-е сутки определили активность полифенолоксидазы спектрофотометрически (MRC, modelUV-200-RS, Израиль) по увеличению оптической плотности при длине волны 590 нм. Для этого навеску растительного материала (1 г) гомогенизировали в 25 мл калий-фосфатного буфера (0,06М, pH=7,2). Полученный гомогенат центрифугировали при 5000g в течение 10 минут. Экстракцию проводили при температуре 4°С. Супернатант использовали в качестве образца для анализа.

Реакционная смесь содержала: 1 мл супернатанта, 1 мл фосфатного буфера (pH=7,2), 1 мл 0,02% диэтилпарафенилендиамина и 1 мл 1% пирокатехина. В контрольных вариантах последнее заменили 1 мл дистиллированной воды. Активность выражали в мкмолях на грамм сырой массы за единицу времени [мкмоль$\cdot$г$^{-1}\cdot$мин$^{-1}$] (Ермаков, 2007). Расчет активности полифенолоксидазы осуществили по формуле:

$$\mathbf{A = (\Delta D/t \cdot N)/(m \cdot l)}$$

где, $\Delta D/t$ – изменения оптической плотности за единицу времени [ед.опт.плот/сек]
N – разведение, $N=V_{колбы} / V_{пробы}$ (учитывает какую долю всего экстракта измерили)
m – сырая масса навески [г]
l – толщина кюветы [см].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенных экспериментов на различных сортах пшеницы было установлено, что контрольные и опытные образцы исследуемых сортов отличаются друг от друга по активности фермента полифенолоксидазы, численные значения которых представлены ниже в таблице 1.

Как видно из полученных данных, наибольшая активность фермента наблюдалась в проростках пшеницы сорта Дагдаш, наименьшая – в проростках сорта Гарабаг. Необходимо отметить, что в проростках твердого сорта пшеницы Гарабаг под действием наночастиц оксида железа окисление фенолов практически не происходило.

Анализ данных, представленных в виде диаграмм на рисунках 1 и 2, показал, что в двух из протестированных сортов твердой пшеницы (Ягут и Гарагылчыг-2) окисление полифенолов в обработанных образцах увеличивалось на 9,84% и 6,06%, соответственно. В проростках сорта Гырмызы бугда наночастицы оксида трехвалентного железа можно сказать не оказывали влияния на активность полифенолоксидазы (рис. 1).

Таблица 1. Активность полифенолоксидазы в двухнедельных проростках пшеницы

Название сорта пшеницы	**Активность полифенолоксидазы в контрольных вариантах [мкмоль·г$^{-1}$·мин$^{-1}$]**	**Активность полифенолоксидазы в опытных образцах, обработанных наночастицами Fe_2O_3 [мкмоль·г$^{-1}$·мин$^{-1}$]**
Гырмызы бугда	0,111±0,008	0,109±0,007
Гарабаг	0,081±0,0012	0,0008±0,00002
Ягут	0,183±0,022	0,201±0,024
Гарагылчыг-2	0,165±0,005	0,175±0,03
Мирбашир-128	0,110±0,001	0,096±0,004
Гобустан	0,083±0,052	0,152±0,024
Дагдаш	0,186±0,007	0,206±0,011
Шеки-1	0,179±0,0002	0,185±0,015

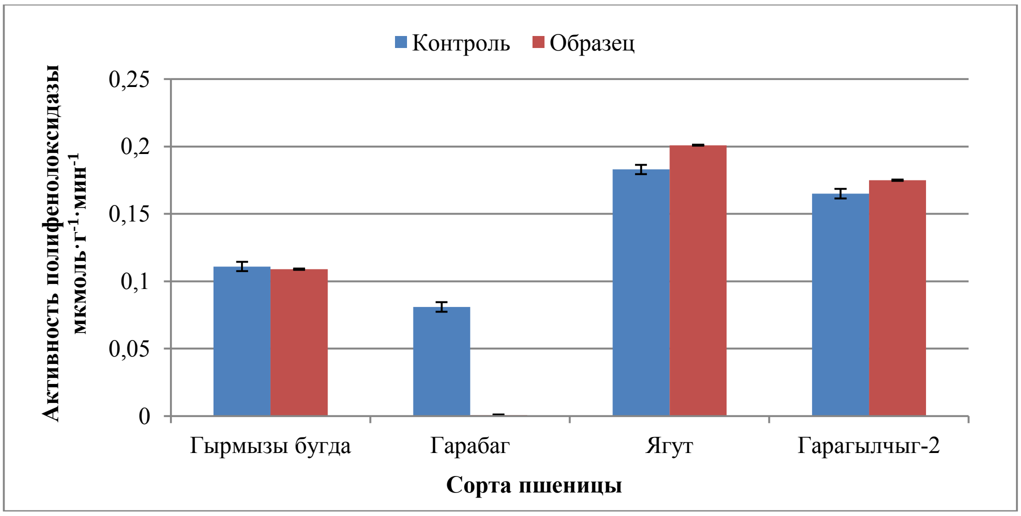


Рис. 1. Сравнительная характеристика активности полифенолоксидазы в контрольных и обработанных двухнедельных проростках твердых сортов пшеницы.

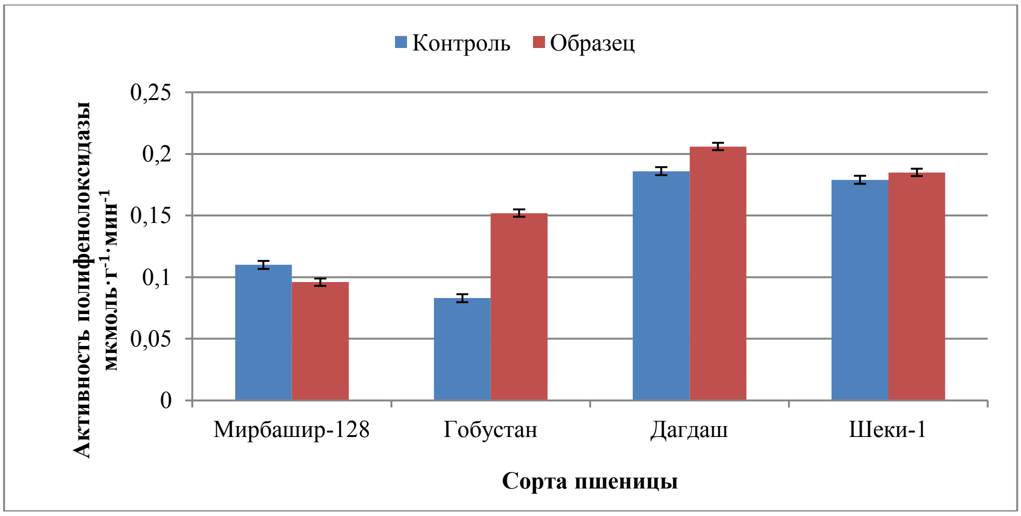


Рис. 2. Сравнительная характеристика активности полифенолоксидазы в контрольных и обработанных двухнедельных проростках мягких сортов пшеницы.

Что касается мягких сортов пшеницы, то в трех из четырех протестированных сортов обработка семян наночастицами оксида железа приводила к усилению окисления полифенолов, что носило более выраженный характер для проростков сорта Гобустан и составило приблизительно 83,13% по сравнению с контрольным вариантом. В проростках опытных образцов сорта Мирбашир-128 наночастицы оксида железа не способствовали повышению активности полифенолоксидазы. Поскольку в литературе отсутствуют какие-либо данные относительно влияния наночастиц железа и его оксидов на содержание полифенолов и активность полифенолоксидазы в проростках пшеницы, мы провели сравнительный анализ наших данных с литературными источниками, которые отражают в себе данные об особенностях влияния тяжелых металлов на полифенолоксидазную активность в злаковых. Согласно результатам этих работ было выявлено, что ионы никеля и свинца способствуют повышению полифенолоксидазной активности злаковых растений, а именно в проростках пшеницы, ячменя и гречихи (Синютина и др., 2013; Мазей и др., 2011). Также не было выявлено данных относительно сортовых различий воздействия наночастиц.

Как известно, полифенолоксидаза оказывает отрицательное влияние на цвет, качество муки и макаронных изделий (Тарасенко, 2015). Согласно же результатам наших исследований, можно выделить в отдельную группу сорта пшеницы, в которых наночастицы оксида трехвалентного железа способствуют снижению активности полифенолоксидазы, а это может послужить основанием для использования семян таких сортов пшеницы как Гырмызы бугда, Габаг и Мирбашир-128 в целях получения мучных изделий высокого качества.

Итак, в результате проведенных экспериментов было выявлено, что интенсивность фенольного метаболизма в проростках пшеницы под воздействием наночастиц оксида трехвалентного железа зависит от сортовых характеристик. В связи с этим изучение окисления полифенолов под воздействием наночаситиц оксида металлов в различных сортах пшеницы заслуживает продолжения работ в этом направлении.

ВЫВОДЫ

Установлено, что интенсивность фенольного метаболизма в проростках пшеницы под воздействием наночастиц оксида трехвалентного железа зависит от сортовых характеристик. В проростках протестированных сортов

твердой пшеницы наночастицы оксида трехвалентного железа приводили либо к незначительному усилению окисления полифенолов (Ягут и Гарагылчыг-2), либо к резкому снижению активности полифенолоксидазы (Гарабаг), либо практически не вызывали каких-либо изменений (Гырмызы бугда) в интенсивности окисления полифенолов. В случае мягких сортов пшеницы, среди протестированных образцов под воздействием наночастиц оксида трехвалентного железа наблюдалось повышение активности полифенолоксидазы, за исключением одного сорта (Мирбашир-128). Полученные данные позволяют нам выделить сорта пшеницы, в которых наночастицы оксида трехвалентного железа способствуют снижению активности полифенолоксидазы, что имеет практическое значение с точки зрения изготовления высококачественных мучных изделий.

ЛИТЕРАТУРА

Ермаков И.П. и др. (2007) Физиология растений: учебник для студ. вузов. М.: Академия, 2007: 464-465.

Коваленко Л.В. (2006) Биологически активные нанопорошки железа. М.: Наука, 2006: 57-58.

Креславский В.Д. и др. (2012) Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений. *Физиология растений*, **59(2):**163-178.

Мазей Н.Г., Медная А.Е. (2011) Влияние тяжелых металлов и пониженных температур на морфо-физиологические процессы проростков гречихи и пшеницы. *Известия Пензенского Государственного Педагогического Университета имени В. Г. Белинского, естественные науки*, **№ 25:** 624-631.

Олениченко Н.А., Осипов В.И., Загоскина Н.В. (2006) Фенольный комплекс листьев озимой пшеницы и его изменение в процессе низкотемпературной адаптации растений. *Физиология растений*, **53:** 554-559.

Синютина С.Е., Можаров А.В., Зайченко М.А. (2013) Влияние солей свинца и никеля на ферментативную активность ячменя. *Вестник ТГУ*, **18(1):** 255-257.

Тарасенко С.С. (2015) Увеличение выхода макаронной муки высшего сорта на основе изучения ферментного состава тонкодисперсных продуктов. Оренбургский Государственный Университет, 1001-1003.

Фролова С.А., Титов А.Ф., Таланова В.В. (2011) Влияние низкотемпературного закаливания на активность протеолитических ферментов и их ингибиторов в листьях проростков пшеницы и огурца. *Физиология растений*, **58:** 208-212.

Janas K., Cvikrová M., Palagiewicz A. et al. (2002) Constitutive elevated accumulation of phenylpropanoids in soybean roots at low temperature. *Plant Science*, **163:** 369-373.

Lin D. (2007) Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environ. Pollut.*, **150(2):** 243-250.

Masarovicova E., Kralova K., Sersen F., (2013) Plant responses to toxic metal stress. Handbook of plant and crop stress. In: *CRC Press*, 595-634.

Üç valentli dəmir oksidi nanohissəciklərinin buğda cücərtilərində polifenoloksidaza fermentinin aktivliyinə təsiri

G.H. Məmmədli[1], S.N. Ömərova[1], A.Ə. Quliyev[1], İ.V. Əzizov[2]

[1]*Bakı Dövlət Universiteti, Bakı, Azərbaycan*
[2] *AMEA-nın Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutu, Bakı, Azərbaycan*

Üç valentli dəmir oksidi nanohissəciklərinin iki həftəlik müxtəlif növ bərk və yumşaq buğda cücərtilərində fenol birləşmələrinin miqdarının dəyişməsinə təsiri öyrənilmişdir. Alınan nəticələr polifenoloksidaza fermentinin aktivliyini göstərir. Bu məqsədlə müvafiq metodik üsullardan istifadə edilmişdir. Müəyyən olunmuşdur ki, buğda cücərtilərində üç valentli dəmir oksidi nanohissəciklərin təsiri nəticəsində fenolların metabolizminin intensivliyi növ xüsusiyyətlərindən asılıdır. Sınaqdan keçmiş bərk buğda növü cücərtilərində üç valentli dəmir oksidi nanohissəciklərin təsiri ya fenol birləşmələrin oksidləşməsinin cüzi artımına (Yaqut və Qaraqılçıq-2), ya polifenoloksidaza fermentinin aktivliyinin kəskin azalmasına (Qarabağ) səbəb olmuşdur, ya da polifenolların oksidləşməsində heç bir dəyişikliyə səbəb olmamışdır (Qırmızı buğda). Yumşaq buğda nümunələrində isə Mirbəşir-128 növü istisna olmaqla üç valentli dəmir oksidi nanohissəciklərin təsiri nəticəsində polifenoloksidaza fermentinin aktivliyinin artımı müşahidə edilmişdir. Əldə edilən məlumatlar yüksək keyfiyyətdə un məhsullarını əldə etmək üçün buğda sortlarının seçilməsi üçün əsas ola bilər. Əldə olunan nəticələr yüksək keyfiyyətli un məmulatlarının istehsalında istifadə olunan buğda sortlarının seçimində köməklik göstərə bilər.

Açar sözlər: *Bərk və yumşaq buğda növləri, fenol birləşmələr, polifenoloksidaza, üç valentli dəmir oksidi nanohissəcikləri*

The effect of nanoparticles of three-valent iron oxide on the activity of polyphenoloxidase in wheat seedlings

G.H. Mammadli[1], S.N. Omarova[1], A.A. Kuliyev[1], I.V. Azizov[2]

[1]*Baku State University, Baku, Azerbaijan*
[2]*Institute of Molecular Biology and Biotechnologies, Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku, Azerbaijan*

The change in the content of phenolic compounds in two-week-old seedlings of various varieties of durum and bread wheat under the influence of three-valent iron oxide nanoparticles was studied. The obtained data testified the activity of the enzyme polyphenoloxidase. For this purpose, guidelines were used. It has been established that the intensity of phenolic metabolism in wheat seedlings under the influence of three-valent iron oxide nanoparticles depends on the varietal characteristics. In the seedlings of tested durum wheat varieties, nanoparticles of three-valent iron oxide led either to a slight increase in the oxidation of polyphenols (Yagut and Garagylchyg 2), or to a sharp decrease in the activity of polyphenoloxidase (Garabagh), or practically did not cause any changes (Gyrmyzy bughda) in oxidation intensity of polyphenols. In the case of bread wheat varieties, the activity of polyphenoloxidase, under the influence of three-valent iron oxide nanoparticles increased (except Mirbashir-128). The resulting data may serve as a basis for selection of wheat varieties to obtain flour products of high quality.

Keywords: *Durum and bread wheat varieties, phenolic compounds, polyphenoloxidase, nanoparticles of three-valent iron oxide*